H. S. Wellcome Esq.
with the authors' compliments.

SONDERABDRUCK.

BERICHTE

DER

DEUTSCHEN

CHEMISCHEN GESELLSCHAFT.

JAHRGANG XXXI. HEFT 9.

223. F. Gowland Hopkins und Stanislaw N. Pinkus: Zur Kenntniss der Einwirkung von Halogenen auf Proteïne.

BERLIN 1898.

WELLCOME INSTITUTE
LIBRARY
Coll. welMOmec
Call
No. P
5708



18733

223. F. Gowland Hopkins und Stanislaw N. Pinkus: Zur Kenntniss der Einwirkung von Halogenen auf Proteïne.

[Physiologisches Laboratorium der Guy's Hospital Medical School.]

(Eingeg. am 16. Mai; Abschnitt I[1]) mitgetheilt in der Sitzung von Hrn. M. Krüger.)

Die Beobachtung des Einen von uns, dass aus eiweisshaltigen Harnen das Albumin durch Brom nahezu quantitativ ausgefällt wird, hatte es nahe gelegt, die Reaction und die in ihr entstehenden Producte näher zu untersuchen. Schon die einleitende qualitative Prüfung erwies, dass die Halogene durch Proteïnstoffe, — gelöst oder coagulirt, — sehr energisch absorbirt werden, und dass den hierbei entstehenden Verbindungen die Tendenz innewohnt, die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Muttersubstanzen beizubehalten. Diese Thatsache schien zu der Annahme zu berechtigen, dass die Halogenirungsproducte, wenn überhaupt, so jedenfalls charakteristische Spaltungsstücke des Moleküls darstellen; es galt daher, das in Angriff zu nehmende Gebiet so vielseitig als möglich nach einer Substanz abzusuchen, die das geeignetste Material für weiteres Vordringen zu liefern versprach, und gleichzeitig festzustellen, ob sich die Reaction an der Hand einer geeigneten Methode nicht für die Charakterisirung der einzelnen Repräsentanten der Gruppe verwenden liesse, ohne von den rein empirischen Bahnen der Untersuchung abzuweichen.

Auf dem nichts weniger als sicheren Gebiete der Proteïnforschung ist die Halogenirung merkwürdigerweise eine der am wenigsten beachteten Reactionen geblieben. Seit den im Jahre 1840 veröffentlichten Untersuchungen Mulder's[2]) über die directe Einwirkung von Chlorgas auf einige Proteïde (Eialbumin, Serumalbumin, Gelatine und Keratin) ist 1885 ein kurzer Bericht über die Bromirung des Eiweisses von Loew[3]) veröffentlicht worden. Erst die Entdeckung des »organisch gebundenen Jods« in der Schilddrüse hat in den letzten 2 Jahren eine Reihe von Arbeiten gezeitigt, deren Ergebnisse vor der Hand jedoch mehr pharmakologisches, als chemisches Interesse besitzen. Die Verfasser besagter Arbeiten »unterstützen« die Halogenirung durch Erhitzen auf dem Wasserbade in Gegenwart verdünnter Schwefelsäure und compliciren so die Reaction in einer vorläufig unberechenbaren Weise. Eine derartige Behandlung der Frage ist für Zwecke, wie sie oben angedeutet, vollkommen unanwendbar. Wir glauben besonders betonen zu müssen, dass es in Anwendung auf die Proteïne mehr, denn auf andere Verbindungen, von grundlegender Bedeutung ist, die

---

[1]) Vergl. diese Berichte 30, 1860. Journal of Physiology 22, 184.

[2]) Journ. prakt. Chem. 44, 487 (1840).

[3]) Journ. prakt. Chem. (N. F.) 31, 318.

Reaction, welcher Art sie auch sei, möglichst einseitig und eindeutig verlaufen zu lassen.

Von diesem Standpunkte aus ist vor allem das Ovalbumin untersucht worden. Chlor und Brom reagiren mit demselben unter Bildung voluminöser Niederschläge bereits in der Kälte und ohne nachweisbare Temperaturerhöhung. Nur die Einwirkung von Jod erfordert ein Anwärmen auf 40°, um in der 1-procentigen Lösung einen Niederschlag hervorzubringen; jedoch beginnt, — wie auch K. Dieterich[1]) gezeigt hat, — die Absorption schon bei Zimmertemperatur. Die so erhaltenen Producte enthalten als mögliche Verunreinigungen: freies Halogen, Halogenwasserstoff und anorganische Salze; unverändertes Eiweiss oder Syntonin waren in keinem Falle nachzuweisen.

Behufs Reinigung wurden sie in 1-procentiger Sodalösung gelöst und mit 2-procentiger Essigsäure ausgefällt; durch andauernde Dialyse und nachfolgendes Auswaschen mit Alkohol erhält man die Substanzen vollkommen aschefrei (Gruppe I). Weit zuverlässigere Resultate liefert die Benutzung ihrer Löslichkeit in Alkohol, woraus sie durch Aether gefällt werden (Gruppe II). Dieses Verfahren lässt sich noch dahin modificiren, dass man während des Lösens Brom zusetzt und die Lösung in bromhaltigen Aether giesst. Diese Operation lässt sich wiederholen und führt endgültig, nach andauerndem Auswaschen mit Aether, zu Substanzen, deren hoher Reinheitsgrad durch die Uebereinstimmung der Analysen genügend gezeigt wird (Gruppe III).

Jedes der angeführten Verfahren führt zu einer besonderen Gruppe von Verbindungen von sehr constantem Halogengehalt:

	Chlor	Brom	Jod pCt.
Gruppe I.	1.89 } [2])	3.92	6.28
Gruppe II.	3.60 }	10.82	17.94 [2])
Gruppe III.	6.07	14.91	—

Wie bereits früher (l. c.) angeführt, steht der Halogengehalt der correspondirenden Verbindungen im annähernden Verhältnisse der Atomgewichte der Substituenten, was auf eine analoge Zusammensetzung derselben zu schliessen gestattet. Die Producte stellen, wenn schnell getrocknet, amorphe Pulver dar, I und II gelblich, die sub III röthlich-weiss; langsam getrocknet bilden sie amorphe hornartige Massen, getrocknetem Eiweisse täuschend ähnelnd. Sie besitzen sämmtlich einen zusammenziehenden bitteren Geschmack, blähen sich, ohne zu schmelzen, zwischen 160° und 200° auf unter Abgabe von Halogenwasserstoff und gleichzeitiger Verkohlung; sie dialysiren weder aus wässrig-alkalischer, noch aus alkoholischer Lösung, geben die Xanthoproteïn- und Biuret-Reaction, letztere mit besonderer

---

[1]) Chem. Centralbl. 1897, I, 1129 und II, 423.

[2]) Vergl. Experimenteller Theil.

Brillanz, — jedoch weder Millon's noch Adamkiewicz' Reaction noch, wie vorauszusehen, die Reaction auf lose gebundenen Schwefel. In heissem Alkohol sind sie ziemlich löslich, schwerer in kaltem Alkohol, Aceton, Glycerin, Wasser, sehr wenig löslich in Essigester, unlöslich in Aether, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Chloroform und Tetrachlorkohlenstoff. Sie sind kräftige Säuren, die Kohlensäure aus deren Verbindungen austreiben und mit Schwermetallen, besonders mit Quecksilber, Blei und Silber schwer lösliche Salze bilden. Durch saure Permanganatlösung werden sie sehr langsam angegriffen; auch alkalisches Kaliumpermanganat wird nicht augenblicklich reducirt; es geht die Färbung in grün über, und erst nach längerem Stehen oder energischem Erhitzen erfolgt die Bildung eines Niederschlages und Entfärbung. Beim Kochen mit Säuren und bei tryptischer Verdauung (schwieriger bei peptischer) geben sie dialysirende halogenhaltige Substanzen, die die Peptonreaction zeigen. Die Lösungen in 1-procentiger Soda sind ziemlich beständig, jedoch tritt bei längerem Stehen Zersetzung ein. Es wurde daher Verfahren (I) als vergleichende Methode von vornherein verworfen und das höchste Bromirungsproduct, das die grösste Uebereinstimmung der Analysen zeigt und die beste Garantie für eine gleichförmige Darstellung bietet, als Vergleichsgrundlage angenommen, umsomehr, als es sich erwies, dass sich die Bromverbindungen (I) und (II) mit Sicherheit in (III) überführen lassen.

	Darstellung des Ausgangsmaterials	Proc. Brom absorbirt.	Asche
Ovalbumin	Verdünnt mit Wasser	15.00	—
Kryst. Ovalbumin			
Fraction 1	Nach Hofmeister	15.29	—
» 2		16.48	—
» 3		15.67	—
» 4		12.64	—
» 5		12.79	—
Serumalbumin 1 .	Fractionirt mit $(NH_4)_2SO_4$, Endfraction	12.61	—
» 2 .	Ausgesalzen mit $(NH_4)_2SO_4$	12.15	—
» 3 .	Nach Hammarsten	12.94	—
Serumglobulin 1 .	Halbsättigen mit $(NH_4)_2SO_4$	14.03	—
» 2 .	Sättigen mit $MgSO_4$	13.[illegible]2	0.732 pCt.
» 3 .	Durch Verdünnung mit Wasser ausgefällt	13.53	—
Caseïn	Lösen in Ammoniak, Ausfällen mit Essigsäure.	11.17	—
Protoalbumose . .	(Grübler)	16.30—17.12	—
Deuteroalbumose .	(Grübler)	17.63	—

Wie ersichtlich, zeigen sich in dem Bromgehalte der verschiedenen Proteïnderivate beträchtliche Unterschiede. Es zeigen sich dieselben

auch für Derivate derselben Substanzen bei verschiedener Darstellungsweise derselben, was den Werth einiger Trennungsmethoden als solcher eventl. sehr in Frage stellen dürfte. Es bezieht sich dieses auf die Trennungen mittels Salzlösungen oder Salzen, und namentlich auf das Krystallisiren des Eiweisses. Die analytischen Daten, die wir oben anführen, zeigen bedeutende Unterschiede in dem Bromabsorptionsvermögen der einzelnen Fractionen. Ob diese Unterschiede auf das ursprüngliche Vorhandensein zweier oder mehrerer Albumine im Eiweiss zurückzuführen sind, oder ob sie eine Spaltung des Albuminmoleküls andeuten, lässt sich bei dem jetzigen Stande der Frage kaum voraussehen[1]). Es ist nicht ganz von der Hand zu weisen, dass die Einwirkung der Salze auf die Proteïde, statt lediglich physikalischer Natur zu sein, gleichzeitig auch einen Einfluss auf den chemischen Charakter des Moleküls haben kann.

Aus den angeführten Daten lässt sich wohl der Schluss ziehen, dass die Bromirung der Proteïne und nachfolgende Behandlung der Bromirungsproducte, wie angegeben, ein werthvolles Material für die Beurtheilung der Eiweisskörper zu liefern verspricht, besser jedenfalls und bequemer in der Erlangung, als die Feststellung des Procentgehaltes an Schwefel, oder der Beziehung zwischen den Procenten Kohlenstoff und Stickstoff. — Wir beabsichtigen vor der Hand die Methode auf die krystallisirten und, im Zusammenhange, auf die unter dem Einflusse von Salzlösungen befindlichen Proteïde anzuwenden; andererseits haben wir die coagulirten Albumine im Vergleich mit den nicht coagulirten, und lebendes Eiweiss im Vergleich mit todtem in den Kreis unserer Untersuchung gezogen. Die Resultate derselben wollen wir in kurzer Folge erscheinen lassen.

Gleichzeitig soll auch die rein chemische Richtung der Forschung nicht aus dem Auge gelassen werden. Es liegen in den beschriebenen Bromirungsproducten Verbindungen vor, die unstreitbar einen vollkommen neuen Angriffspunkt für die Constitutionsfrage geben, selbst wenn sie nicht unmittelbare Eiweissderivate, sondern, wie viel wahrscheinlicher, lediglich Fragmente des Moleküls sind. Die bis jetzt bekannten Spaltungsstücke des Eiweisses sind fast sämmtlich Producte der Hydrolyse, von denen sich kaum sagen lässt, ob sie auch nur die allgemeinen Züge des Muttermoleküls beibehalten haben. Die durch die Bromirung verursachten Aenderungen liegen höchst wahr-

---

[1]) Es ist nicht ohne Interesse, dass bei den höheren Fractionen, die eine schwache Diffusibilität zu zeigen scheinen, der Bromgehalt der Derivate sich demjenigen der Protalbumosederivate, für die niederen Fractionen hingegen dem des Serumalbumins nähert. Ob dieser nahen Uebereinstimmung Identität der Verbindungen zu Grunde liegt, oder ob dieselbe zufällig ist, soll die weitere Forschung zeigen.

scheinlich in einer von der vorigen verschiedenen Richtung, während sich die Möglichkeit einer Hydrolyse durch den entstehenden Halogenwasserstoff durch Zusatz von $KClO_3$ und $KBrO_3$ fast vollkommen umgehen lässt; der Halogengehalt der so erhaltenen Producte ist der gleiche, wie der der ohne obigen Zusatz gewonnenen, und es scheint demnach während der Halogenirung, resp. nach derselben, keine Hydratirung durch die gebildete Säure stattzufinden.

Soweit man nach Analogien urtheilen darf, werden durch vorsichtige Halogenirung in der Kälte kaum so durchgreifende Aenderungen im Baue der Proteïne eintreten, wie bei der Hydrolyse, zumal die Haupttendenz der tiefgehenden Albuminspaltung rein hydrolytischer Natur ist. Es scheint uns nicht undenkbar, dass es gelingen könnte, durch Halogenirung das Eiweissmolekül auch in seinen labileren Existenzphasen sozusagen zu »fixiren«, und so auch die feineren Unterschiede im Baue desselben in statu quo vorläufig durch die Function ihres Bromabsorptionsvermögens auszudrücken.

Experimenteller Theil.

I. *Ovalbumin.*

A. Bromirungsproducte.

Das Eiweiss wird durch Kattun gepresst, mit Wasser angerührt, auf das 20-fache seines Volums verdünnt und mit verdünnter Essigsäure bis zur schwach, aber deutlich sauren Reaction versetzt. Es filtrirt dann nach 24-stündigem Stehen auch durch Kattun vollkommen klar; eine solche Lösung enthält 0.6—0.7 pCt. Albumin.

Die Albuminlösung wurde in einer mit Glasstopfen verschlossenen Flasche mit Brom versetzt und gründlich geschüttelt. Das Brom wird anfangs sehr begierig absorbirt, ohne das Aussehen der Lösung wesentlich zu ändern, ausser dass sich um die einfallenden Bromtropfen dünne Membranen bilden. Erst durch Zusatz eines gegen das Berechnete bedeutenden Ueberschusses an Brom scheidet sich plötzlich durch die ganze Lösung hindurch ein dicker voluminöser Niederschlag aus, der sich ziemlich schnell absetzt; es empfiehlt sich, in allen Fällen, so viel Brom zuzusetzen, dass nach Absetzen des Niederschlages die darüber stehende Flüssigkeit mit Brom gesättigt erscheint. — Während des gesammten Verlaufes der Reaction ist weder eine Gasentwickelung, noch irgend eine Aenderung der Temperatur bemerkbar, selbst wenn man das Brom in grösseren Quantitäten auf einmal einträgt. — Der Niederschlag ist in bromhaltigem Wasser fast unlöslich, nicht unerheblich löslich in reinem, und scheint durch letzteres in seiner Zusammensetzung geändert zu werden. Wäscht man ihn möglichst schnell mit Bromwasser, dann mit reinem, trocknet

in vacuo über Kali, wäscht dann mit Alkohol und Aether, so enthält das Product 14.04 pCt. Brom[1]).

0.2216 g Sbst.: 0.0731 g AgBr.

Dialysirt man dasselbe dagegen anhaltend, so enthält es endgültig (nach Nachwaschen mit Alkohol und Aether und Trocknen in vacuo) 10.54 pCt. Brom.

0.2872 g Sbst.: 0.0716 g AgBr.

1. Product I erhalten durch Lösen des Niederschlages in 1-procentiger Sodalösung. Der Niederschlag löst sich, solange er feucht ist, in Alkalien mit grösster Leichtigkeit. Die Lösungen in 1-procentiger Soda sind leicht weingelb; durch verdünnte Essigsäure wird aus denselben ein weisser flockiger Niederschlag gefällt, der im Ueberschusse der Säure unlöslich ist; in Alkohol ist derselbe viel schwerer löslich, als das ursprüngliche Product, dagegen etwas leichter in Wasser. Analysen[2]):

0.2590 g Sbst.: 0.0233 g AgBr = 3.84 pCt. Br. }
0.3500 g Sbst.: 0.0316 g AgBr = 3.85 pCt. Br. }
0.2120 g Sbst.: 0.0199 g AgBr = 4.02 pCt. Br.
0.2610 g Sbst.: 0.0242 g AgBr = 3.95 pCt. Br.
0.2800 g Sbst.: 0.0262 g AgBr = 3.99 pCt. Br.

Schon beim Lösen des Bromirungsproductes in der 1-procentigen Soda macht sich ein leicht aromatischer, entfernt an Blausäure erinnernder Geruch bemerkbar; jedoch scheint dasselbe in dieser Lösung gegen eine Woche unzersetzt verweilen zu können, wenigstens diffundirt es innerhalb dieser Zeit nicht durch Pergamentpapier, und giebt, wenn mit verdünnter Essigsäure ausgefällt, in der Analyse denselben Bromgehalt wie vorher. Es gelang uns nicht, im Filtrat des durch Säure ausgefällten Productes Blausäure nachzuweisen. — Das Lösen scheint in zwei Stadien zu verlaufen, die vielleicht der Bildung zweier Reihen von Salzen entsprechen. Reibt man den Niederschlag mit 0.25-procentiger Natriumcarbonatlösung an, so erhält man eine leicht opalescirende gelbliche Flüssigkeit, von gegen Lakmus entschieden saurer Reaction, die äusserst schwer filtrirt; setzt man soviel Natriumcarbonatlösung hinzu, dass eine etwa 1-procentige Natriumcarbonatlösung resultirt, so wird die Lösung etwas tiefer in der Farbe und vollkommen klar und

[1]) Die Analysen wurden nach Carius ausgeführt. Die Substanz, wie alle folgenden, wird durch Salpetersäure nur sehr schwierig vollkommen zerstört; das Erhitzen muss daher auf nicht unter 280° 9—12 Stunden fortgesetzt werden. Der endgültige Zerfall der Substanzen scheint gegen 250—270° zu liegen, da bei dieser Temperatur die Röhren häufig sprangen.

[2]) Das Analysenmaterial wurde hier, wie auch im Folgenden, jedesmal frisch dargestellt: Analysen von Producten, erhalten aus denselben Eiweisslösungen, sind eingeklammert.

filtrirt mit grösster Leichtigkeit. Beide Lösungen werden durch Salze der Schwermetalle gefällt; die Quecksilber-, Kupfer-, Blei-, Silber- und auch die Eisenoxyd-Salze sind schwer löslich; langsamer scheiden sich aus: Cobalt-, Nickel-, Cadmium- und Zink-Salze. Die kaustischen Erden bilden insgesammt leicht lösliche Verbindungen, sodass man mit verdünnten Barytsalzlösungen die Producte auf ihre Reinheit untersuchen kann. Ausser den überschüssigen Carbonaten werden nämlich durch Barytsalze, nach Zusatz einiger Tropfen Ammoniak, Zersetzungsproducte ausgefällt, die bei längerem Stehen der alkalischen Lösungen gebildet werden; dieselben diffundiren mit grosser Leichtigkeit und geben keine Biuretreaction. Sie scheinen schneller zu entstehen, wenn man die Bromirungsproducte in Alkohol löst, in welch' letzterem Falle nicht unerhebliche Mengen Ammoniak entbunden werden.

Die pankreatische Verdauung verläuft in alkalischer Lösung äusserst schnell; schwerer werden die Substanzen durch Pepsin verdaut, vielleicht wegen ihrer geringen Löslichkeit; Zusatz von Säure ist letzterenfalls überflüssig. In beiden Fällen entstehen bromhaltige dialysirende Substanzen, die ihren Peptoncharakter in ihrer rothen Biuretreaction offenbaren. Dasselbe Verhalten zeigen auch die Chlorirungs- und Jodirungs-Producte.

Physiologisch scheinen diese, wie auch die in der Folge zu beschreibenden Substanzen sehr energisch zu wirken; es sei an diesem Orte bemerkt, dass sie an sich keinerlei desinficirende Eigenschaften besitzen, dass sie vielmehr, sobald das freie Halogen entfernt ist, einen günstigen Nährboden für Mucor und Schimmelpilze darzustellen scheinen. Das Leben von Bacterien vermögen die reinen alkalischen Lösungen der Bromirungsproducte nicht aufrecht zu erhalten; einige derselben (z. B. B. typhi abdom., B. Cholerae) gehen sehr schnell unter, andere (B. subtilis, B. Anthracis) zeigen alsbald Sporenbildung; manche bleiben 2—3 Wochen erhalten, jedoch ohne sich erheblich zu vermehren (B. Actinomyces, B. tuberculos., B. Coli Com.). Weitere Untersuchungen werden zeigen, inwiefern sich die hier beschriebenen Substanzen als Differenzirungsmittel für Mikroorganismen bewähren. Die Ergebnisse derselben sollen an anderer Stelle mitgetheilt werden.

2. Behandeln des rohen Bromirungsproductes mit Alkohol. — Das Rohproduct wird, noch feucht, aber genügend von Wasser abgepresst, sorgfältig mit Alkohol angerieben, mit der genügenden Menge Alkohol verdünnt und dann auf dem kochenden Wasserbade möglichst schnell bis zum Sieden erhitzt; man kann so die gesammte Menge in Lösung bringen, ein Zeichen, dass in dem Rohproduct kein Syntonin enthalten ist. 100 Theile siedenden Alkohols lösen 6.2,

100 Th. kalten Alkohols — (bei 17°) — 3.38 Theile der Substanz (bestimmt nach V. Meyer).

Die alkoholischen Lösungen dialysiren weder gegen Alkohol, noch gegen Wasser; durch Quecksilberchlorid, Kupferacetat, Bleiacetat, nicht aber durch Eisensalze, wird die Substanz aus diesen Lösungen gefällt. Für die optische Untersuchung sind letztere, ebenso wie die Lösungen in Natriumcarbonat, zu dunkel, und es ist uns bis jetzt nicht gelungen, eine sichere Methode zur Bestimmung kleinerer Mengen der beschriebenen Producte in Lösung zu finden.

Die Lösung wird durch einen Heisswassertrichter in kalt gehaltenen Aether fliessen gelassen; das ausfallende Product ist dann gewöhnlich aschefrei, widrigenfalls es noch feucht in siedendem absolutem Alkohol gelöst, mit Aether gefällt und gewaschen und in vacuo bis zur Gewichtsconstanz getrocknet wird.

0.2300 g Sbst.: 0.0590 g AgBr = 10.92 pCt. Br.
0.2828 g Sbst.: 0.0710 g AgBr = 10.69 pCt. Br.
0.2646 g Sbst.: 0.0664 g AgBr = 10.69 pCt. Br.
0.2461 g Sbst.: 0.0625 g AgBr = 10.81 pCt. Br.
0.3462 g Sbst.: 0.0888 g AgBr = 10.91 pCt. Br.
0.2092 g Sbst.: 0.0533 g AgBr = 10.84 pCt. Br.
0.2821 g Sbst.: 0.0728 g AgBr = 10.98 pCt. Br.

Mittel 10.82 pCt. Br.

C u. H: 1) 0.2164 g Sbst.: 0.3480 g CO_2 = 43.85 pCt. C. 0.1311 g H_2O = 6.73 pCt. H.

2) 0.2346 g Sbst.: 0.2822 g CO_2 = 43.50 pCt. C. 0.1442 g H_2O = 6.83 pCt. H.

Die Verbrennungen müssen in möglichst langen Röhren ausgeführt werden (gefüllt mit Kupferoxyd und Bleichromat), da sowohl die vorgelegte Silber-, wie auch die reducirte Kupfer-Spirale ziemlich lang sein müssen; die Substanz wird im Kupferboot mit viel Kupferoxyd und Bleichromat gemischt und die Verbrennung sehr langsam eingeleitet, da sich die Substanz schon bei niedriger Temperatur zersetzt, sich dabei stark aufbläht und eine schwer verbrennliche Glanzkohle zurücklässt.

N: 0.2052 g Sbst.: 21.2 ccm N (14°, 768 mm) = 12.27 ccm N.

S: 0.2828 g Sbst.: 0.0228 g $BaSO_4$ = 1.11 pCt. S.
0.3644 g Sbst.: 0.0296 g $BaSO_4$ = 1.12 pCt. S.

---

3. Versetzt man die Lösung in Alkohol mit Brom und giesst in bromhaltigen Aether, so erhält man, nach sorgfältigem Auswaschen mit Aether und Trocknen wie oben, ein röthlich-weisses Pulver. Analysen:

Br: 0.2050 g Sbst.: 0.0722 g AgBr = 14.98 pCt. Br.
0.1887 g Sbst.: 0.0660 g AgBr = 14.88 pCt. Br.
0.2050 g Sbst.: 0.0714 g AgBr = 14.82 pCt. Br.
0.1998 g Sbst.: 0.0698 g AgBr = 14.87 pCt. Br.
0.1890 g Sbst.: 0.0662 g AgBr = 14.90 pCt. Br.
0.2048 g Sbst.: 0.0717 g AgBr = 14.90 pCt. Br.
0.2520 g Sbst.: 0.0889 g AgBr = 15.02 pCt. Br.
0.2255 g Sbst.: 0.0792 g AgBr = 14.95 pCt. Br.
Mittel 14.91 pCt. Br.

C und H: 0.2114 g Sbst.: 0.3194 g CO_2 = 41.21 pCt. C. 0.1176 g H_2O = 6.18 pCt. H.
0.2206 g Sbst.: 0.3337 g CO_2 = 41.25 pCt. C. 0.1224 g H_2O = 6.16 pCt. H.

N: 0.2412 g Sbst.: 23.4 ccm N (10°, 765 mm) = 11.69 pCt. N.

S: 0.1274 g Sbst.: 0.0171 g $BaSO_4$ = 1.08 pCt. S.
0.2618 g Sbst.: 0.0199 g $BaSO_4$ = 1.05 pCt. S.

Die aus Alkohol gefällten Substanzen halten sich sehr lange unverändert. Das Verhältniss von C : N ist in beiden Producten das gleiche, und übereinstimmend mit dem im Ovalbumin.

Um zu einem Urtheile zu gelangen, inwiefern die die Bromirung begleitende Bildung von Bromwasserstoff auf den Charakter der entstehenden Producte einwirkt, wurde die Bromirung in Gegenwart von Kaliumbromat vorgenommen, letzteres angewandt in einer Menge gleich der des angewandten Broms. Die Reaction verlief normal; das nach III behandelte Product enthielt 14.79 pCt. Br.

0.2100 g Sbst.: 0.0730 g AgBr = 14.79 pCt. Br.

Hält man beim Lösen der Substanzen in Alkohol die oben angegebenen Maassregeln nicht ein, so bleibt ein gallertartiger Rückstand zurück, der sich auch bei Zusatz von weiterem Alkohol nicht löst.

0.3514 g Sbst.: 0.1020 g AgBr = 8.28 pCt. Br.

Gegenseitiges Verhältniss der drei Typen. Wie sich aus der Zusammenstellung der Halogenisirungsproducte ergiebt, lassen sich bei den Bromproducten des Ovalbumins die drei verschiedenen Typen sicherer und beständiger in der Zusammensetzung erhalten, als bei den Chlor- und Jod-Producten. Es schien daher, trotzdem eingehende Constitutionsfragen über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinausreichen würden, doch nothwendig festzustellen, ob die verschiedenartige Behandlung grundlegende Aenderungen in dem Molekülgerüste mit sich führe.

Es wurde ein Product, das laut Analyse 10.69 pCt. Br enthielt, in Soda gelöst, mit Essigsäure gefällt, mit Alkohol und dann mit Aether gewaschen und in vacuo getrocknet.

Die Analyse ergab: 0.2765 g Sbst.: 0.0274 g AgBr = 4.22 pCt. Br, in genügender Uebereinstimmung mit den für Product I gefundenen Resultaten.

Löst man das Rohbromirungsproduct in Soda, setzt Essigsäure bis nahe zur Fällung hinzu, fällt mit Brom, löst den Niederschlag in bromhaltigem Alkohol und giesst in bromhaltigen Aether, so erhält man Product III.

0.2008 g Sbst.: 0.0707 g AgBr = 15.1 pCt. Br.

Es handelte sich nunmehr nur noch um Feststellung der Umwandelbarkeit des Productes II in Product III und vice versa.

Das Bromirungsproduct wurde von freiem Brom befreit, wie oben in Alkohol gelöst und die Hälfte in bromfreien Aether gegossen.

0.2821 g Sbst.: 0.0728 g AgBr = 10.98 pCt. Br,

die andere Hälfte wurde mit Brom versetzt und in bromhaltigen Aether gegossen:

0.2048 g Sbst.: 0.0717 g AgBr = 14.90 pCt. Br.

Eine andere Quantität des Rohproductes wurde unter Bromzusatz in Alkohol gelöst und die Hälfte der Lösung in bromhaltigen Aether gegeben:

0.2255 g Sbst: 0.0792 g AgBr = 14.95 pCt. Br.

Darauf wurde die andere Hälfte so lange erhitzt, bis sämmtliches Brom vertrieben war und mit reinem Aether gefällt:

0.2092 g Sbst.: 0.0533 = 10.84 pCt. Br.

Der in Alkohol unlösliche Rückstand wird in 0.1-procentiger Kalilauge gelöst, mit Brom gefällt und nach der Alkohol-Aether-Methode behandelt:

0.2520 g Sbst.: 0.0889 g AgBr = 15.02 pCt. Br.

B. Chlorirungsproducte.

Der Charakter derselben und die Darstellung sind im Wesentlichen die gleichen wie oben. Beim Einleiten von Chlor in die Eiweisslösung wird dasselbe gierig absorbirt; um die aufsteigenden Gasblasen beginnen sich gegen das Ende der Reaction Membranen zu bilden, und dann, wenn die Lösung mit Chlor gesättigt ist, erscheint die Flüssigkeit plötzlich mit einem dicken Niederschlage durchsetzt.

Derselbe, in 1-procentiger Soda gelöst, mit Essigsäure ausgefällt und nachbehandelt wie oben, enthält 3.62 pCt. Chlor.

0.3620 g Sbst.: 0.0538 g AgCl = 3.67 pCt. Cl.
0.1978 g Sbst.: 0.0280 g AgCl = 3.50 pCt. Cl.
0.2074 g Sbst.: 0.0304 g AgCl = 3.62 pCt. Cl.

Diese Grösse fügt sich im Verhältniss zu den entsprechenden Bromverbindungen in Reihe II ein; ein dem Producte der Reihe I entsprechendes, mit 1.90 pCt Cl, erhält man bei andauerndem Stehenlassen der schwach alkalischen Lösung.

0.2002 g Sbst.: 0.1056 g AgCl = 1.93 pCt. Cl.
0.2844 g Sbst.: 0.0214 g AgCl = 1.86 pCt. Cl.

Aus der Lösung in Alkohol fällt Aether ein Product, das dem Product III entspricht.

0.2174 g Sbst.: 0.0548 g AgCl = 6.03 pCt. Cl.

0.2138 g Sbst.: 0.0524 g AgCl = 6.11 pCt. Cl.

Chlorirt man die Eiweisslösung nach Zusatz von Kaliumchlorat, löst den erhaltenen Niederschlag in Alkohol und fällt mit Aether, so erhält man ein Product von demselben Procentgehalt an Chlor, wie oben:

0.2139 g Sbst.: 0.0534 g AgCl = 6.17 pCt. Cl.

Das rohe Chlorirungsproduct, ausgewaschen und anhaltend dialysirt, enthält 6.41 pCt. Cl.

0.2410 g Sbst.: 0.0625 g AgCl = 6.41 pCt. Cl.

In den Producten der Reihe III scheint das Chlor sehr lose gebunden zu sein; dieselben vermögen das Jod aus Jodkalium freizumachen.

C. Jodirungsproducte.

Bei der Darstellung derselben gestalten sich die Verhältnisse etwas verschieden. Das Eiweiss absorbirt zwar schon bei gewöhnlicher Temperatur beträchtliche Quantitäten Jod, jedoch tritt erst beim Anwärmen auf 35—40° Fällung eines Niederschlages ein, ebenso plötzlich, wie in den vorhergehenden Fällen. Mit Natriumsulfit-Lösung gewaschen, sorgfältig dialysirt, stellt derselbe ein grauweisses Pulver dar, enthaltend 7.2 pCt. Jod.

0.2202 g Sbst.: 0.02934 g AgJ = 7.2 pCt. J.

Das Jodirungsproduct löst sich in 1-procentiger Sodalösung etwas schwerer, als die vorhergehenden, doch sind seine Lösungen beständiger. Mit Essigsäure gefällt und getrocknet wie oben, enthält es gegen 6.28 pCt. J.

0.2277 g Sbst.: 0.0263 g AgJ = 6.24 pCt. J.

0.2790 g Sbst.: 0.0325 g AgJ = 6.29 pCt. J.

0.2574 g Sbst.: 0.0300 g AgJ = 6.30 pCt. J.

Bei Versuchen, die Alkohol-Aether-Methode auf diese Substanz anzuwenden, ergab es sich, dass aus derselben nur sehr kleine Mengen in den Alkohol gehen, die, mit Aether ausgefällt, einen dem der aus alkalischer Lösung gefällten Substanz fast gleichen Gehalt an Jod zeigen.

0.0690 g Sbst.: 0.0084 g AgJ = 6.6 pCt. J.

Nur in zwei Fällen gelang es uns, auf diesem Wege zu Producten zu kommen, die in ihrem Jodgehalt mit den Bromproducten II proportioniren.

0.2170 g Sbst.: 0.0719 g AgJ = 17.89 pCt. J.

0.2613 g Sbst.: 0.0872 g AgJ = 18.01 pCt. J.

Wir geben die beiden letzteren Analysen mit allem Vorbehalt, da es uns in keiner Weise gelungen ist, die Bedingungen festzustellen, unter denen die Verbindungen entstehen. Die bereits ange-

führte Thatsache, dass das höhere Chlorirungsproduct III aus Jodkalium Jod freimacht, lässt vermuthen, dass die höheren Jodirungsproducte des Eiweisses, wenn überhaupt darstellbar, nicht sehr beständige Körper sind.

Es wäre von hohem Interesse, den beschriebenen Substanzen das Halogen zu entziehen und die Eigenschaften ihrer gemeinsamen Grundlage kennen zu lernen. Bis jetzt sind sämmtliche Versuche in dieser Richtung fehlgeschlagen; bei Anwendung energischer Mittel, wie Erhitzen mit alkoholischem oder wässrigem Kali, mit Natriumalkoholat, mit Anilin etc. tritt tiefgehende Zersetzung ein; Reduction mit Natriumamalgam in wässriger oder alkoholischer Lösung führt zu schmierigen, harzigen Producten. Metallisches Zink oder Aluminium scheinen nicht im Stande zu sein, sämmtliches Halogen zu entziehen; bei Einwirkung von Zink- oder Aluminium-Amalgam werden unerquicklich harzige Stoffe erhalten. Es werden diese Versuche fortgesetzt, und gleichzeitig wird die Frage von einer anderen Seite in Angriff genommen.

Wir sind gegenwärtig damit beschäftigt, die Einwirkung bei gewöhnlicher Temperatur wirksamer Oxydationsmittel, wie Wasserstoffsuperoxyd, Ammoniumpersulfat u. a. auf das Eiweiss zu untersuchen. Das Studium der hierbei erhaltenen Producte soll uns den Factor der reinen Oxydation der Eiweissstoffe liefern und wird möglicher Weise auch physiologische Analogieen nahelegen.

Im Weiteren wurden sämmtliche Bromirungsproducte, wenn nicht besonders vermerkt, wie das Bromproduct III des Ovalbumins behandelt.

II. *Krystallisirtes Ovalbumin.*

Das Krystallisiren des Eiweisses wurde genau nach Hofmeister's Vorschrift vorgenommen, mit lediglich einer Abweichung. Da es sich zeigte, dass die mit Ammonsulfat versetzten Eiweisslösungen Ammoniak entbanden, so wurden sie mit einer 0.5 pCt. Essigsäure enthaltenden, halbgesättigten Ammonsulfat-Lösung bis zur schwach sauren Reaction versetzt. Nach mehrtägigem Stehen schieden sich feine Nadeln, theils fächerartig, theils in Rosetten aus. Der Niederschlag wurde umkrystallisirt, und zwei auf einander folgende Fractionen bromirt, beide bestehend aus Nädelchen, ohne die geringste Beimengung von Globuliten.

Fraction I ergab ein Product enthaltend 15.29 pCt. Br.

0.2739 g Sbst.: 0.0984 g AgBr = 15.29 pCt. Br.

Das aus Fraction II gewonnene enthielt 16.48 pCt. Br.

0.1312 g Sbst.: 0.0508 g AgBr = 16.48 pCt. Br.

Ein aus einer neuen Menge gewonnener Niederschlag, der nach dem Umkrystallisiren, wie die vorigen, nur aus Nadeln bestand, lieferte ein Bromproduct mit 15.67 pCt. Br.

0.1934 g Sbst.: 0.0712 g AgBr = 15.67 pCt. Br.

Die röthlich gefärbten Mutterlaugen, aus denen sich in der Folge ein rosarother Niederschlag, aus Globuliten bestehend, ausschied, zeigen ein viel niedrigeres Bromabsorptionsvermögen.

Das erhaltene Bromirungsproduct enthielt 12.72 pCt. Br.

0.2188 g Sbst.: 0.0650 g AgBr = 12.64 pCt. Br.

0.2202 g Sbst.: 0.0662 g AgBr = 12.79 pCt. Br.

Es ist uns unterdessen gelungen, mit Hülfe einer einfacheren Methode das Krystallisiren des Eiweisses zu beschleunigen[1]), und wir gedenken mit dem so gewonnenen Material das Studium dieser interessanten Verbindung fortzusetzen.

III. *Serumalbumin und Serumglobulin.*

Das für die Versuche benutzte Serum wurde Hammelblut entnommen. Um das Serum möglichst rein zu erhalten, empfiehlt es sich, die Wandungen des Gefässes, in dem man das Blut auffängt, mit verdünntem Alkohol abzuspülen.

A) Aus dem Serum wurde das Globulin durch Halbsättigen mit Ammonsulfat ausgefällt; darauf wurde Ammonsulfat bis zu $^3/_4$ Sättigung zugesetzt, die ausgeschiedene Fraction verworfen, die durch vollkommene Sättigung mit Ammonsulfat gewonnene Endfraction umgelöst und gefällt, durch Dialyse von Ammonsulfat nahezu befreit, wie das Ovalbumin bromirt und das Bromirungsproduct wie oben aufgearbeitet.

0.2383 g Sbst.: 0.0706 g AgBr = 12.61 pCt. Br.

Das Globulin wurde gegen fliessendes und dann gegen destillirtes Wasser so lange dialysirt, bis es sich auszuscheiden begann, dann durch Zusatz von etwas Ammonsulfat wieder in Lösung gebracht und bromirt.

0.2220 g Sbst.: 0.0732 g AgBr = 14.03 pCt. Br.

B) Aus dem durch Halbsättigen mit Ammonsulfat vom Globulin befreiten Serum wurde das Albumin durch Sättigen mit Ammonsulfat ausgefällt; nach andauerndem Dialysiren, Ausfällen und nochmaligem Dialysiren wurde es bromirt.

Br 0.1982 g Sbst.: 0.0566 g AgBr = 12.15 pCt. Br.

C u. H 0.2092 g Sbst.: { 0.3516 g CO_2 = 45.83 pCt. C.
0.1212 g H_2O = 6.43 pCt. H.

N 0.2020 g Sbst.: 20.2 g ccm N (14°, 765 mm) = 11.84 pCt. N.

S 0.1982 g Sbst.: 0.0195 g $BaSO_4$ = 1.35 pCt. S.

---

[1]) Eine Notiz über dieselbe soll demnächst in dem Journal of Physiology erscheinen.

Aus einem Theile des Serums wurde das Globulin durch 20-faches Verdünnen mit destillirtem Wasser gewonnen, dasselbe wurde zweimal umgelöst und ausgefällt, und dann bromirt.

0.1782 g Sbst.: 0.0566 g AgBr = 13.53 pCt. Br.

C) Das Serum wurde mit feingepulvertem Magnesiumsulfat gesättigt, das ausgeschiedene Globulin dialysirt und bromirt. Das Product erwies sich auch nach wiederholtem Umlösen in Alkohol und Ausfällen mit Aether aschehaltig.

0.5467 g Sbst.: 0.004 g Asche = 0.732 pCt.

0.2396 g Sbst.: 0.0773 g AgBr (nach Abzug für Asche) = 13.92 pCt. Br.

Durch Zusatz von feingepulvertem Natriumsulfat bis zur Sättigung erhält man das Albumin. Dasselbe wurde wie oben behandelt und bromirt. Das Bromirungsproduct war vollkommen aschefrei:

0.3188 g Sbst.: 0.0966 AgBr = 12.90 pCt. Br.

0.2552 g Sbst.: 0.0778 AgBr = 12.98 pCt. Br.

Trotz vollkommener Sättigung mit Magnesiumsulfat und Natriumsulfat enthielt das Filtrat noch eine nicht unerhebliche Quantität eines eiweissartigen Körpers, dessen Bromirungsproduct in seinem Verhalten von dem beschriebenen vollkommen abweicht; dasselbe ist in Alkohol sehr leicht löslich und wird bei Zusatz von Aether als weisses Pulver ausgefällt, das nach einiger Zeit zu einem zähen Harz zerfliesst. Letzteres erhärtet nach kurzem Stehen zu einer durchsichtigen leimartigen Masse. Die Substanz oxydirt sich ausserordentlich schwer, und es ist uns bis jetzt nicht gelungen, mit derselben zu sicheren Resultaten zu kommen.

Die Bromirungsproducte des Serumalbumins und Serumglobulins besitzen im Allgemeinen sämmtliche Eigenschaften derjenigen des Ovalbumins; in Alkohol sind sie um vieles leichter löslich, als die letzteren.

IV. *Protalbumose.*

Die Protalbumose (Grübler) wurde in 5-procentiger Lösung unter sorgfältigem Kühlen mit Bromwasser behandelt. Zwar ist auch hier kein Ansteigen der Temperatur bemerkbar, jedoch erhält man beim Bromiren über $+ 5^0$ harzige Massen, deren weitere Verarbeitung grosse Schwierigkeiten bereitet. Man darf daher, so lange man das Bromirungsproduct nicht in Lösung hat, die Temperatur nie über die obige steigen lassen. Beim Einhalten dieser Bedingung erhält man das Bromirungsproduct als pulverigen Niederschlag, den man schnell auf dem Eistrichter abfiltrirt.

Der Niederschlag ist in Wasser und in Alkohol leicht löslich. Die Biuretreaction ist roth und ausserordentlich intensiv. Lässt man den Niederschlag warm werden, so zerfliesst er zu einem Harz, das dann zu einer braunen, durchsichtigen, spröden Masse erstarrt. Auch das durch Ausfällen mit eiskaltem Aether aus der stark gekühlten

alkoholischen Lösung als weisses Pulver gewonnene Product theilt dieses Verhalten. Dasselbe sintert schnell zu einer klebrigen Masse zusammen, die sich beim Trocknen im Vacuumexsiccator aufbläht, sich trübt und zu einer amorphen, spröden, graubläulichen Masse erstarrt. Es ist zwar möglich, das Product einige Zeit unter Aether unverändert zu erhalten; sobald derselbe jedoch verdampft, ändert es sich augenblicklich. Auch Füllen des Exsiccators mit Kohlensäure vermag dieser Umwandlung nicht vorzubeugen.

Es wurde daher der Niederschlag auf einem Uhrglase in den Exsiccator gebracht, darauf zerfliessen gelassen und, sobald erstarrt, mit Aether ausgewaschen und andauernd in vacuo getrocknet; beim andauernden Stehen scheint er Halogenwasserstoff abzugeben:

0.2576 g Sbst.: 0.1036 AgBr = 17.12 pCt. Br.
0.2050 g Sbst.: 0.0801 AgBr = 16.63 pCt. Br.
0.2095 g Sbst.: 0.0831 AgBr = 16.86 pCt. Br.
0.2385 g Sbst.: 0.0912 AgBr = 16.28 pCt. Br.
0.2481 g Sbst.: 0.0962 AgBr = 16.50 pCt. Br.

Beständiger in ihrem Bromgehalt sind die Bromirungsproducte der

V. *Deuteroalbumose.*

Bei der Bromirung derselben hat man dieselben Vorsichtsmaassregeln einzuhalten, wie bei der Protoalbumose. In seinem allgemeinen Verhalten: Löslichkeit, Biuretreaction, Veränderlichkeit, ist das Bromderivat der Deuteroalbumose dem der Protoalbumose durchaus gleich. Es ist von demselben nur in dem Bromgehalt verschieden.

0.2259 g Sbst.: 0.0930 g AgBr = 17.52 pCt. Br.
0.2268 g Sbst.: 0.0944 g AgBr = 17.72 pCt. Br.
0.2214 g Sbst.: 0.0918 g AgBr = 17.64 pCt. Br.

Das merkwürdige Verhalten der Bromirungsproducte beider obiger Substanzen tritt in erhöhtem Maasse hervor bei dem

Antipepton,

das in letzter Zeit durch die Untersuchungen Siegfried's u. A. in den Vordergrund des Interesses getreten ist. Beim vorsichtigen Bromiren und nicht zu starkem Kühlen gelingt es, einen gelblichen Niederschlag zu erhalten. Derselbe löst sich leicht schon in kaltem Alkohol, aus welcher Lösung eiskalter Aether sehr wenig niederschlägt. Das so erhaltene Product ist jedoch so schnell veränderlich, dass wir bei den geringen Mengen, die uns zur Verfügung standen, nicht Material genug für weitere Untersuchung gewinnen konnten.

Durch Kupferacetat und Quecksilbersalze wird das Bromproduct aus der alkoholischen Lösung ausgefällt; auch das Anilinsalz ist schwerlöslich. Es giebt, wie die Muttersubstanz, keine Biuretreaction und schmeckt intensiv sauer und bitter.

VI. *Caseïn.*

Dasselbe wurde dargestellt durch Ausfällen aus Milch mit Essigsäure, wiederholtes Umlösen in 1-procentigem Ammoniak und dann endgültig mit Aether ausgezogen. Das Bromirungsproduct enthielt 11.17 pCt. Brom.

0.2984 g Sbst.: 0.0783 g AgBr = 11.17 pCt. Br.

VII. *Hämoglobin.*

Benutzt wurde Hundeblut und daraus das Hämoglobin nach Hoppe-Seyler dargestellt. Man erhält es sehr rein und in grossen Krystallen; letztere müssen fein zerrieben und sehr allmählich in Wasser eingetragen werden, da das Hämoglobin sonst zu einer schmierigen Masse zusammenfliesst, die sehr schwer in Lösung zu bringen ist. Die Lösung absorbirt Brom sehr begierig und scheidet einen flockigen braunen Niederschlag aus. Im Filtrat lässt sich Bromeisen nachweisen.

Der Niederschlag ist ausserordentlich leicht löslich, schon in kaltem Alkohol; fällt man ihn daraus mit Aether, so muss man Sorge tragen, sehr schnell abzufiltriren, da andernfalls der Niederschlag in Alkohol, selbst in heissem, sehr schwer löslich wird. Merkwürdiger Weise hält die Verbindung, selbst wenn drei Mal in Alkohol gelöst und mit Aether ausgefällt, kleine Mengen Eisen zurück:

0.1055 g Sbst.: 0.0005 g Fe_2O_3 = 0.332 pCt. Fe.
0.0474 g Sbst.: 0.0002 g Fe_2O_3 = 0.420 pCt. Fe.

Der Gehalt an Eisen ist dem des Hämoglobins sehr nahe — wahrscheinlich ein Spiel des Zufalls.

Gelatine.

Das Bromirungsproduct derselben verhält sich ganz wie die der Albumosen und Peptone; nur ist es mehr von theerartiger Beschaffenheit. Da die Darstellung reiner Gelatine, die keine Millon'sche Reaction giebt, längere Zeit in Anspruch nimmt, so ziehen wir es vor, die Veröffentlichung der erlangten Resultate bis zu geeigneter Zeit aufzuschieben.

London, den 10. Mai 1898.

A. W. Schade's Buchdruckerei in Berlin S., Stallschreiberstr. 45/46.